

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de Noviembre de 2005 (10.11.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/105834 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/08,
C12N 7/04, A61K 39/12

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070052

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de Abril de 2005 (27.04.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200401044 30 de Abril de 2004 (30.04.2004) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006
MADRID (ES). BIONOSTRA, S.L. [ES/ES]; C/ Ronda
de Poniente, 4 - 2º C-D, E-28760 TRES CANTOS
(MADRID) (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): RUIZ
CASTÓN, José [ES/ES]; Centro Nacional de Biotec-
nología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES).
SAUGAR GÓMEZ, Irene [ES/ES]; Centro Nacional
de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID
(ES). LUQUE BUZO, Daniel [ES/ES]; Centro Nacional
de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID
(ES). ABAITUA ELUSTONDO, Fernando [ES/ES];
Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco,
E-28049 MADRID (ES). OÑA BLANCO, Ana, M^a

[ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, Campus de
Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES). GONZÁLEZ
DE LLANO, M^a, Dolores [ES/ES]; Centro Nacional de
Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Cien-
tíficas, Campus de Cantoblanco, E-28049 MADRID (ES).
RODRÍGUEZ AGUIRRE, José, F. [ES/ES]; Centro
Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investi-
gaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049
MADRID (ES). RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA,
Juan, Ramón [ES/ES]; BIONOSTRA, S.L., C/ Ronda de
Poniente, 4 - 2º C-D, E-28760 Tres Cantos (MADRID)
(ES).

(74) Mandatario: ARIAS, SANZ Juan; ABG PATENTES,
S.L., Orense 68, 7ª Planta, 28020 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

[Continúa en la página siguiente]

WO 2005/105834 A1

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF EMPTY VIRAL CAPSIDS IN YEASTS, SAID CAPSIDS COMPRISING
PROTEINS DERIVED FROM PVP2 OF THE VIRUS THAT CAUSES INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBDV)

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUES-
TAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE PVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFE-
CIOSA (IBDV)

(57) Abstract: The invention relates to empty capsids of the virus that causes infectious bursal disease (IBDV), comprising the
assembly of proteins which are derived from protein pVP2 of IBDV, of different sizes. The aforementioned capsids can be used in
the production of vaccines and in the preparation of vectors for gene therapy.

(57) Resumen: Las cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por
ensamblaje de proteínas derivadas de la proteína pVP2 de IBDV, de distinto tamaño y tienen aplicación en la producción de vacunas
y en la elaboración de vectores para terapia génica.



— con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

TÍTULO

**PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS
VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2
DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS
5 INFECCIOSA (IBDV)**

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un procedimiento para la producción de cápsidas virales vacías compuestas por proteínas derivadas de la proteína pVP2
10 (pVP2*) del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV). Dichas cápsidas pueden ser utilizadas en la producción de vacunas y en la elaboración de vectores para terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) es un miembro de la familia Birnaviridae que infecta diferentes especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223 -235; van den Berg TP et al. 2000. Infectious
20 bursal disease (Gumboro disease). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19:509-543).

Las partículas de IBDV son icosaédricas con una simetría T=13, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las
25 aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de partículas virales vacías. En base a estos estudios, se ha comprobado que la superficie externa de la partícula está formada por un
30 entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), los cuales, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28

kDa), también podría formar parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Las proteínas VP2, VP3, y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido (o poliproteína) precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa autocatalíticamente liberando los péptidos pVP2 (VPX), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas 1on y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El péptido pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína (VP2), que es la que se encuentra en las partículas purificadas. Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas, y requiere la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada. Como es conocido, la morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

Las vacunas convencionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas. Este último tipo de vacunas presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que comprenden la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las partículas pseudovirales (VLPs, del inglés “virus-like particles”), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de la totalidad o parte de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, etc.

La utilización de diferentes vectores para la expresión de genes de IBDV ha permitido desarrollar sistemas de producción de ensamblados virales diferentes. En este sentido, se ha descrito la producción de distintas VLPs de IBDV mediante expresión de la poliproteína viral empleando distintos sistemas de expresión, por ejemplo, células de mamífero (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. J. Gen. Virol. 79:1047-54) o vectores alternativos basados en el empleo de baculovirus recombinantes (rBVs) (Vakharia VN. 1997. Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease. Biotechnology Annual Review 3:151-68; Kibenge FS et al. 1999. Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. Can J Vet Res 63:49-55).

El empleo de dichos vectores virales ha permitido la producción en células de insecto de diferentes tipos de VLPs entre las que se incluyen partículas, formadas por ensamblaje de una proteína VP2 recombinante, de 20-30 nm de diámetro (Min-Ying Wang et al. 2000. Self-Assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 67(1):104-111); VLPs con simetría T=1 obtenidas mediante expresión de una forma quimérica de la proteína VP2 (rVP2-456) (Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology 278:322-331); VLPs que contienen todas las proteínas presentes en la partícula viral (Maraver A et al. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology*

77:6438-49); y VLPs producidas por la expresión de una forma quimérica de la poliproteína viral formada por la fusión de ésta a una proteína heteróloga con el fin de mejorar la eficiencia en la formación de VLPs (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. J. Virol. 76:2384-92).

Los diversos procedimientos de producción de VLPs de IBDV descritos previamente adolecen de diferentes defectos que reducen o impiden su aplicabilidad para la generación de vacunas frente a IBDV ya que:

- (i) los vectores desarrollados para producir VLPs de IBDV se basan en el empleo de virus recombinantes, derivados del virus vacunal o baculovirus, por lo que la producción de dichas VLPs se realiza a partir células de mamífero o de insecto; sin embargo, esos sistemas de producción son muy costosos para su aplicación en la producción a nivel industrial de vacunas veterinarias;
- (ii) la producción de VLPs de IBDV en células de mamífero se basa en el empleo de recombinantes del virus vacunal; sin embargo, además de que ese sistema de producción tiene un costo muy elevado, el empleo de un virus recombinante capaz de infectar tanto mamíferos como aves, no reúne las condiciones de bioseguridad necesarias para su empleo como vacuna;
- (iii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto empleando sistemas de expresión convencionales, por ejemplo, rBVs que expresan únicamente la poliproteína viral, además de costosa, es muy ineficiente y conduce a una producción de VLPs prácticamente nula; y
- (iv) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto mediante la expresión de una poliproteína quimérica, formada por la fusión de la fase de lectura abierta (ORF) correspondiente a una proteína heteróloga al extremo 3' de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV, tiene como resultado la producción de VLPs de IBDV que contienen una proteína de fusión (VP3-proteína heteróloga), lo que introduce un elemento proteico no presente en viriones de IBDV, de efecto desconocido y de dudosa aplicabilidad en la cadena de producción de carne de pollo para consumo humano.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un vector que permita la producción a nivel industrial de vacunas frente a IBDV que subsane la totalidad o parte de los inconvenientes mencionados previamente.

Las levaduras constituyen una alternativa a los sistemas de expresión previamente mencionados por razones de simplicidad y coste de producción. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito la posibilidad de producir en levaduras cápsidas formadas por ensamblaje de la proteína VP2 de IBDV expresada en levaduras. Por el contrario, los resultados obtenidos por distintos grupos de investigadores señalan en la dirección opuesta, es decir, en el sentido de que la expresión de la proteína VP2 de IBDV en levaduras no conduce a la formación de partículas o cápsidas. En relación con esto, Azad et al. (US 5.614.409) describen la producción de una forma altamente inmunogénica de una proteína VP2 recombinante (rVP2) de IBDV, en la que los 5 últimos restos de aminoácidos del extremo amino terminal de la VP2 nativa de IBDV han sido reemplazados por un octapéptido, mediante la expresión de la secuencia codificante de dicha rVP2 en levaduras. Sin embargo, como reconocen los mismos autores, el análisis por microscopía electrónica del material obtenido no reveló la formación de estructuras de partículas definidas (US 5.614.409, columna 8, líneas 64-67). Resultados similares parecen haber sido obtenidos por Pitcovski et al. (Pitcovski J et al. 2003. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. Vaccine 21:4736-4743) quienes, aunque describen la expresión del gen que codifica para la proteína VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y el empleo de un material parcialmente purificado que contiene dicha proteína rVP2 de IBDV para inmunizar animales, no describen la formación de cápsidas formadas por autoensamblaje de dicha rVP2 expresada en *P. pastoris*.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que es posible obtener cápsidas vacías de IBDV mediante la expresión y ensamblaje de una proteína pVP2* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, en levaduras. Dichas cápsidas vacías de IBDV, formadas por autoensamblaje de dicha proteína pVP2* de IBDV, se denominan VLPs-pVP2* en esta descripción.

Dichas VLPs-pVP2* de IBDV contienen uno de los elementos proteicos antigénicamente más relevante presente en los viriones infectivos de IBDV por lo que son capaces de inducir una respuesta inmune o antigénica en un animal y, por tanto, pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico.

- 5 En concreto, se ha observado que la expresión de una proteína pVP2* de IBDV en *Saccharomyces cerevisiae* permite obtener VLPs-pVP2* de IBDV. Dichas VLPs-pVP2* tienen isometría T=1 y son inmunogénicas.

- Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia para la producción de las VLPs de IBDV proporcionadas por esta invención (VLPs-pVP2*)
10 que, a diferencia de los métodos descritos previamente para la producción de VLPs de IBDV (generalmente basados en el empleo de virus recombinantes derivados del virus vacunal o de un baculovirus y en la producción de dichas VLPs a partir células de mamífero o de insecto, sistemas de producción inaceptables para la producción industrial de vacunas veterinarias por razones de bioseguridad, eficiencia y coste),
15 permite la expresión y producción de VLPs de IBDV en levaduras con lo que se subsanan los problemas de bioseguridad y eficiencia y se consigue un significativo abaratamiento de los costes de producción, lo que permite su empleo en la producción industrial de vacunas frente a IBDV. Dicha estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la expresión de una pVP2* de IBDV
20 en levaduras y la formación de VLPs-pVP2* de IBDV, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

- Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs-pVP2* presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y
25 se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico diferencial se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV.
30 Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas mientras que los animales inmunizados con VLPs-pVP2* solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2 de IBDV.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs-pVP2* de IBDV basado en la expresión génica de una proteína pVP2* de IBDV en levaduras.

Los sistemas de expresión y las levaduras desarrolladas para la puesta en
5 práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs-pVP2* de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs-pVP2* de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs-pVP2* de IBDV, que presentan actividad antigénica o inmunogénica frente a la infección causada por IBDV, constituyen un aspecto adicional
10 de esta invención. Asimismo, el empleo de dichas VLPs-pVP2* de IBDV en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica, y/o con fines de diagnóstico constituye un aspecto adicional de esta invención. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una representación esquemática del plásmido pESCURAinv/pVP2-456. El plásmido contiene un fragmento de ADN que contiene la región correspondiente a la poliproteína de IBDV que codifica desde el resto 1 al resto 456 de la proteína VP2 de IBDV, bajo el control transcripcional del promotor inducible
20 por galactosa denominado GAL1. Este plásmido fue utilizado para transformar un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* haploide cepa 499.

La Figura 2 muestra la purificación de estructuras derivadas de IBDV en células de *S. cerevisiae* transformadas con pESCURAinv/pVP2-456 y crecidas en presencia de galactosa (inductor) durante 18 h a 30°C. Los cultivos fueron recogidos y utilizados para
25 la obtención de extractos que fueron posteriormente analizados mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa. Los carriles incluyen muestras correspondientes al extracto total sin fraccionar (I) y a las diferentes fracciones desde la zona inferior a la superior del gradiente (1-37) mediante SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie (Figura 2A), y mediante Western blot empleando suero anti-VP2 de IBDV
30 (Figura 2B). M indica los carriles cargados con marcadores de peso molecular (Dual Color, BIO-RAD).

La Figura 3 muestra la caracterización estructural de ensamblados derivados de IBDV producidos en células de *S. cerevisiae* transformadas con pESCURAinv/pVP2-456. La Figura 3A muestra la caracterización microscópica de VLPs-pVP2*

purificadas; las fracciones 21 a 26 del gradiente mostrado en la Figura 2 fueron mezcladas y analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); en la imagen mostrada se observa la presencia de numerosas partículas isométricas de un tamaño de 23 nm aproximadamente. La muestra fue teñida con acetato de uranilo. La

5 Figura 3B muestra el resultado de un análisis bioquímico, concretamente, la muestra (VLP) fue analizada mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de coomassie. El marcador de peso molecular (M) empleado fue Dual Color (BIO-RAD). La Figura 3C muestra el resultado de un análisis antigénico, concretamente, la muestra (VLP) fue analizada mediante Western blot empleando suero anti-VP2 de IBDV. En las Figuras

10 3B y 3C "M" indica el carril correspondiente a los marcadores de peso molecular (Dual Color, BIO-RAD).

La Figura 4 es un diagrama de barras que ilustra la caracterización de la respuesta humoral frente a VLPs-pVP2-456. Dichas VLPs-pVP2-456 fueron utilizadas para inmunizar pollos SPF de 1 día (Ejemplo 2). La inmunización se realizó empleando

15 un grupo de 7 pollos, con una única dosis de antígeno por vía intramuscular. Como control se utilizó un grupo de pollos que fueron inyectados por vía intramuscular con un volumen idéntico del diluyente del antígeno (PBS). Se tomaron muestras a intervalos de 7 días hasta el día 35. Las muestras de suero fueron analizadas mediante ELISA empleando una dilución de la muestra de suero de 1/500.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término VLP-pVP2* (singular) o VLPs-pVP2* (plural) de IBDV, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad

25 de la bursitis infecciosa (IBDV), en ocasiones denominadas genéricamente VLP-pVP2* o VLPs-pVP2* de la invención, con isometría T=1, constituidas por ensamblaje de una proteína pVP2*, en donde dicha proteína pVP2* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero

30 comprendido entre 441 y 501.

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin

D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43].

El término “proteína pVP2*” se refiere, en general, a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto “n” de la proteína pVP2 de IBDV, en donde “n” es un número entero
5 comprendido entre 441 y 501 e incluye a cualquiera de las diferentes formas de las proteínas pVP2 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*.
10 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como a proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

15 Las proteínas pVP2* particulares se denominan siguiendo el formato “pVP2-n”, donde “n” es el definido previamente. En una realización particular, dicha proteína pVP2* es una proteína seleccionada del grupo formado por:

- (i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto
20 441 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida
25 por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 30 (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida

por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;

(vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y

(viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

La proteína pVP2* de IBDV presente en las VLPs-pVP2* proporcionadas por esta invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende entre 441 y 501 restos de aminoácidos, comenzando a partir del resto número 1, de cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, de la proteína pVP2 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]. En una realización particular, dicha proteína pVP2* de IBDV presente en las VLPs-pVP2* proporcionadas por esta invención es la proteína pVP2-456 cuya secuencia de aminoácidos está comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]. La secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2-456 de IBDV se extiende desde el nucleótido 350 hasta al nucleótido 1719 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2* de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de proteínas pVP2* de IBDV.

El término “análoga”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2* de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de

nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

VLPs-pVP2* de IBDV: procedimiento para su producción y aplicaciones

5 Las VLPs-pVP2* proporcionadas por esta invención pueden obtenerse mediante la expresión de dicha proteína pVP2* de IBDV, en células hospedadoras apropiadas, en particular, levaduras, que contienen la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2* de IBDV en una construcción génica. En una realización particular, dichas células hospedadoras apropiadas son levaduras transformadas con un sistema de
10 expresión adecuado que incluye una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2* de IBDV.

En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de VLPs-pVP2* de IBDV, en adelante procedimiento de la invención, que comprende cultivar una levadura que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una
15 proteína pVP2* de IBDV y que expresa dicha proteína pVP2* de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs-pVP2* de la invención.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende las etapas de:

- 20 a) cultivar células de levadura transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, bajo
25 condiciones que permiten la expresión de dichas proteínas pVP2* y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2* de IBDV; y
- b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs-pVP2* de IBDV.

Como puede apreciarse, el procedimiento de la invención comprende la expresión génica de una proteína pVP2* de IBDV mediante el empleo de un vector que permite la
30 expresión de dicha proteína en levaduras. Para ello, el procedimiento de la invención comprende, como paso previo, la obtención de un sistema de expresión génica, tal como un sistema constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína pVP2* de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho

sistema de expresión, la expresión de las proteínas recombinantes, y, si se desea, el aislamiento de las VLPs-pVP2* de IBDV formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2* de IBDV, y, opcionalmente, la purificación de dichas VLPs-pVP2*.

La obtención de levaduras transformadas con un sistema o vector de expresión que
5 permite la expresión de la proteína pVP2* de IBDV puede ser realizada por un experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook J.1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Las levaduras transformadas se cultivan bajo condiciones,
10 conocidas por los expertos en la materia, que permiten la expresión de las proteínas recombinantes (pVP2*) y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2* de IBDV. Tras la expresión de dicha proteína pVP2* de IBDV en levaduras, las proteínas pVP2* expresadas se ensamblan y forman las VLPs-pVP2* de IBDV, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de
15 dichas VLPs-pVP2* de IBDV de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

El sistema o vector de expresión utilizado para transformar levaduras comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV operativamente
unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y
20 constituye un aspecto adicional de esta invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión útil para transformar levaduras, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2* es una
proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos
25 comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, estando dicha secuencia de nucleótidos codificante para dicha proteína pVP2* de IBDV operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, dicho sistema de expresión proporcionado por esta
30 invención comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a una proteína pVP2* seleccionada entre las proteínas pVP2-441, pVP2-452, pVP2-456, pVP2-466, pVP2-476, pVP2-487, pVP2-494 y pVP2-501.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en dicho sistema de expresión incluyen promotores, que dirigen la transcripción de la secuencia de la proteína pVP2* (a la que está operativamente unido), y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en
5 tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc., todas ellas útiles en levaduras.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación de dicho sistema de expresión. A modo ilustrativo, dichos
10 vectores incluyen plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), etc. que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano, para que pueda ser amplificado en bacterias, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en
15 la materia [Sambrook J et al. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene), por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2-456 (Ejemplo 1.1) que contiene
20 una construcción génica que codifica para la proteína pVP2-456 de IBDV y permite la producción de VLPs-pVP2* de IBDV en levaduras.

El empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs-pVP2* de IBDV constituye un aspecto adicional de esta invención.

25 En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una levadura, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2* de IBDV. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una levadura transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que
30 codifica para dicha proteína pVP2* de IBDV. Prácticamente cualquier levadura puede ser utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha levadura es una levadura del género *Saccharomyces*, por

ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc., una levadura del género *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, etc.

Las VLPs-pVP2* de IBDV pueden ser utilizadas como vectores o vehiculizadores de productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. En una realización particular, dichas moléculas de interés biológico incluyen polipéptidos de interés, tales como antígenos o inductores de respuestas inmunes en animales o humanos a los que se suministre, o bien incluyen secuencias de ácido nucleico, útiles en terapia génica, destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Dichas VLPs-pVP2* de IBDV pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs-pVP2* de IBDV en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente a IBDV. En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs-pVP2* de IBDV, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente a IBDV. En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de VLPs-pVP2* de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs-pVP2* de la invención y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente aceptable farmacéuticamente.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 ilustra la obtención de VLPs-pVP2-456 de IBDV, mientras que el Ejemplo 2 pone de manifiesto la capacidad antigénica de dichas VLPs-pVP2-456 de IBDV en pollos.

EJEMPLO 1

Obtención de VLPs-pVP2* mediante la expresión de diversas regiones de la proteína pVP2 en levaduras

1.1 Obtención de VLPs-pVP2-465 mediante la expresión de la región 1-456 de la proteína pVP2 en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV formadas por autoensamblaje de la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV, denominadas VLPs-pVP2-456, en cultivos de levadura (*Saccharomyces*

cerevisiae) se generó el vector pESCURAinv/pVP2-456. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2-456 (restos 1-456 de la pVP2 de IBDV) en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2-456 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados como Oligo I (SEQ ID NO: 2) y Oligo II (SEQ ID NO: 3) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURAinv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURAinv/pVP2-456 (Figura 1).

El plásmido pESCURAinv/pVP2-456 se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 según un protocolo previamente descrito (Gietz & Woods. 2002. Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs. El análisis de la expresión de la proteína pVP2-456 y la formación de VLPs se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-698).

La colonia seleccionada fue cultivada en medio líquido CSM (-Ura) + YNB

suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras

5 fueron centrifugadas a 3.000 rpm, durante 5 minutos a 4°C, se lavaron con agua destilada 1 vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió 1 volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma). Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso

10 durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa según un protocolo previamente descrito (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms

15 complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento, así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology, Edited by: Fred M. Ausubel, Roger Brent,

20 Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, John Wiley & Sons, http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm] y tinción con azul de coomassie (coomassie blue) e inmunodetección por Western blot empleando suero anti-VP2 [Current Protocols in Molecular Biology, Edited by: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin

25 Struhl, John Wiley & Sons, http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm]. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Como puede observarse en la Figura 2A, la tinción con azul de coomassie reveló la presencia de una proteína con el tamaño (42 kDa) esperado para pVP2-456, junto con proteínas de mayor masa molecular, en diferentes fracciones correspondientes a la zona central del gradiente. La Figura 2B,

30 correspondiente al análisis mediante Western blot, muestra que la bandas detectadas mediante tinción con azul de coomassie corresponden a la proteína pVP2-456 tanto en su forma monomérica como en forma de oligómeros de alto peso molecular. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión del polipéptido pVP2-

456 en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURAinv/pVP2-456.

A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión tal como se ha descrito previamente (Lombardo
5 E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Este análisis se realizó con el producto resultante de mezclar las fracciones 21 a 26 del gradiente indicado en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 3A, el análisis mediante TEM de
10 dichas fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en esa región del gradiente. Las VLPs obtenidas (VLPs-pVP2-456) son isométricas ($T = 1$) y presentan un diámetro de 23 nm y aspecto circular. El subsiguiente análisis mediante SDS-PAGE (Figura 3B) e inmunoblot con suero anti-VP2 (Figura 3C), mostró que la fracción contenía la proteína pVP2-456 con un grado de pureza estimado de, al menos, 95%.

15

1.2 Obtención de VLPs-pVP2* mediante la expresión de otras regiones de la proteína pVP2 en levaduras

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.1 se generaron los vectores que se describen en la Tabla 1 que expresaban en levaduras las VP2* que se relacionan
20 en dicha Tabla 1, en la que se recoge, además, la isometría que presentan las VLPs-pVP2* obtenidas y los iniciadores utilizados.

Tabla 1

Plásmido	pVP2*	Isometría	Iniciador directo	Iniciador inverso
pESCURAinv/pVP2-441	pVP2-441	(a)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 4
pESCURAinv/pVP2-452	pVP2-452	(a)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 5
pESCURAinv/pVP2-466	pVP2-466	(a) (b) (c) (d)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 6
pESCURAinv/pVP2-476	pVP2-476	(a) (b) (e) (f)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 7
pESCURAinv/pVP2-487	pVP2-487	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 8
pESCURAinv/pVP2-494	pVP2-494	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 9
pESCURAinv/pVP2-501	pVP2-501	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 10
pESCURAinv/pVP2-512	pVP2-512	(f)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 11

NOTAS:

- 5 * El número indica el número de restos de aminoácidos de pVP2 de IBDV de cada proteína.
- (a) VLPs T = 1
- (b) VLPs T = 7
- (c) Túbulos 20 nm
- 10 (d) Capsómeros
- (e) VLPs T = 13
- (f) Túbulos 50 nm

EJEMPLO 2**15 Caracterización de la inmunogenicidad de las VLPs-pVP2-456 de IBDV**

Con el fin de determinar la inmunogenicidad de las VLPs-pVP2-456 (Ejemplo 1.1) se realizó un ensayo de inmunización en pollos de 1 día. Un grupo de 7 animales SPF (libre de patógenos específicos) fue inmunizado por vía intramuscular con una única dosis de 200 µl conteniendo 10 µg de VLPs-pVP2-456/animal diluidas en PBS. Un

20 grupo similar fue inyectado con PBS. Se realizaron extracciones semanales de suero de cada uno de los animales de ambos grupos. Los sueros de cada grupo y fecha fueron mezclados para obtener un suero homogéneo (pool) representado por volúmenes equivalentes de cada individuo del grupo. Los sueros fueron analizados mediante ELISA. Para ello, los pocillos fueron tapizados con 10 ng de VLPs-pVP2-456. Los

25 ensayos fueron realizados según un protocolo previamente descrito (Current Protocols

in Immunology. Edited by: Barbara Bierer, John E. Coligan, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, John Wiley & Sons http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm). Los resultados obtenidos, reflejados en la Figura 4, demuestran que una única inmunización en ausencia de adyuvante produce una potente respuesta frente a la proteína pVP2-456.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2*] que comprende cultivar una levadura que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV y que expresa dicha proteína pVP2* de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs-pVP2*, en donde dicha proteína pVP2* de IBDV es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

a) cultivar células de levadura transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV, bajo condiciones que permiten la expresión de dicha proteínas pVP2* y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2* de IBDV; y

b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs-pVP2* de IBDV.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha proteína pVP2* de IBDV se selecciona del grupo formado por:

(i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 441 de la proteína pVP2 de IBDV;

(ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;

(iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;

- 5
- (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 10 (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 15 (vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y
- 20 (viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha levadura es del género *Saccharomyces* o del género *Pichia*.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha levadura es *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *P. pastoris*.

30 6. Un sistema de expresión, útil para transformar levaduras, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2* de IBDV operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha proteína pVP2* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero

comprendido entre 441 y 501.

7. Una levadura que comprende un sistema de expresión según la reivindicación 6.

5 8. Una levadura transformada con un sistema de expresión según la reivindicación 6.

9. Levadura según cualquiera de las reivindicaciones 7 ú 8, en el que dicha levadura es del género *Saccharomyces*.

10

10. Levadura según la reivindicación 9, en el que dicha levadura es *S. cerevisiae* o *S. pombe*.

11. Empleo de un sistema de expresión según la reivindicación 6, o de una
15 levadura según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para la producción de cápsidas virales vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2*].

12. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis
20 infecciosa (IBDV) [VLP-pVP2*] obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

13. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis
25 infecciosa (IBDV) [VLP-pVP2*], caracterizada porque está constituida por ensamblaje de proteínas pVP2* de IBDV expresadas en levaduras, en donde dicha proteína pVP2* de IBDV es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

30 14. Cápsida según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que dicha proteína pVP2* de IBDV se selecciona del grupo formado por:

- (i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 441 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 5 (ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 10 (iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 15 (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 20 (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 25 (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 30 (vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y
- (viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

15. Cápsida según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizada porque tiene isometría T=1.

5 16. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la elaboración de un medicamento.

10 17. Empleo según la reivindicación 16, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa o un vector para terapia génica.

15 18. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

19. Vacuna según la reivindicación 18, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

20 20. Vacuna según la reivindicación 19, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

25 21. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV [VLPs-pVP2*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

1/4

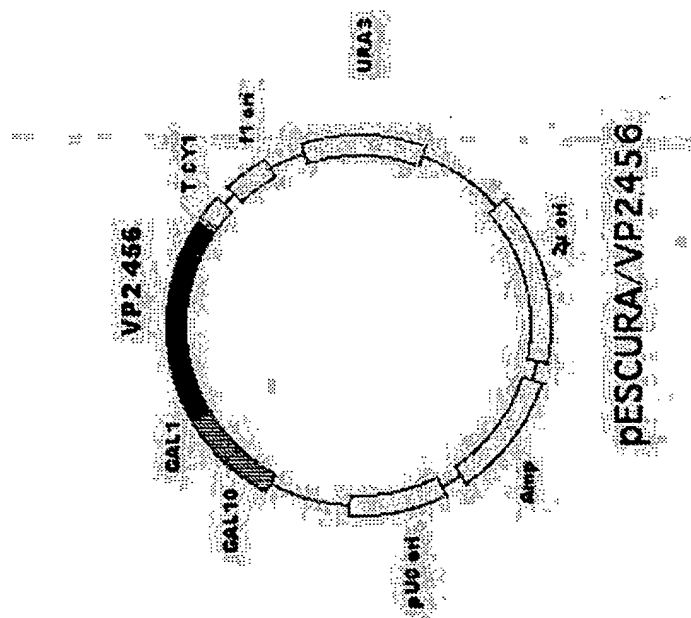
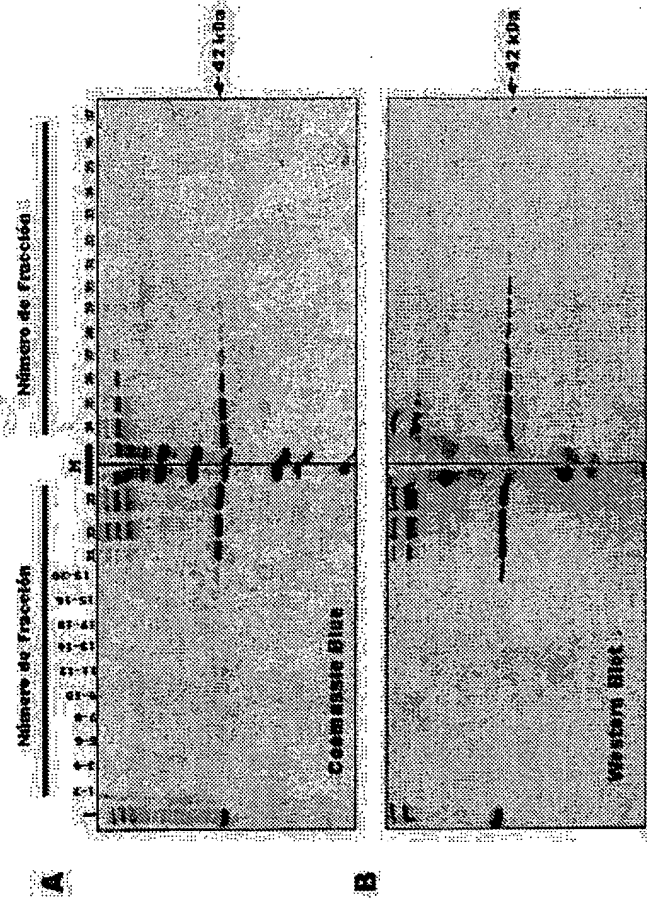
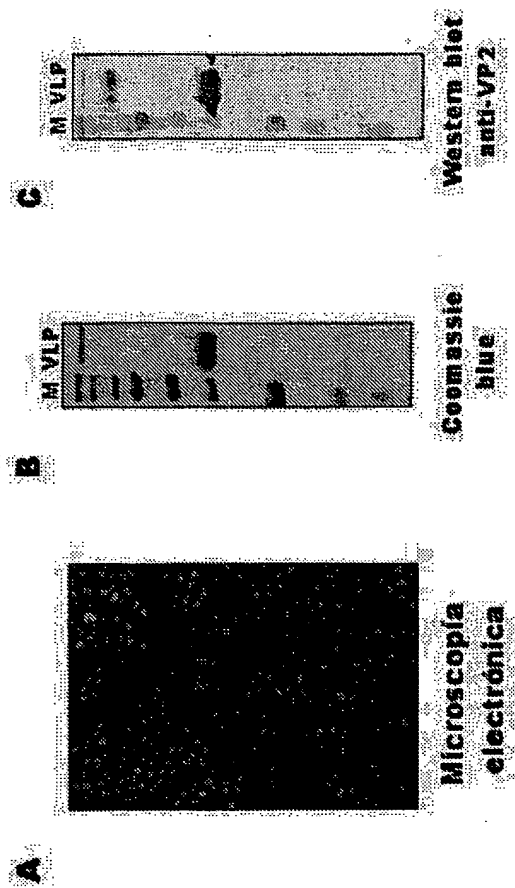


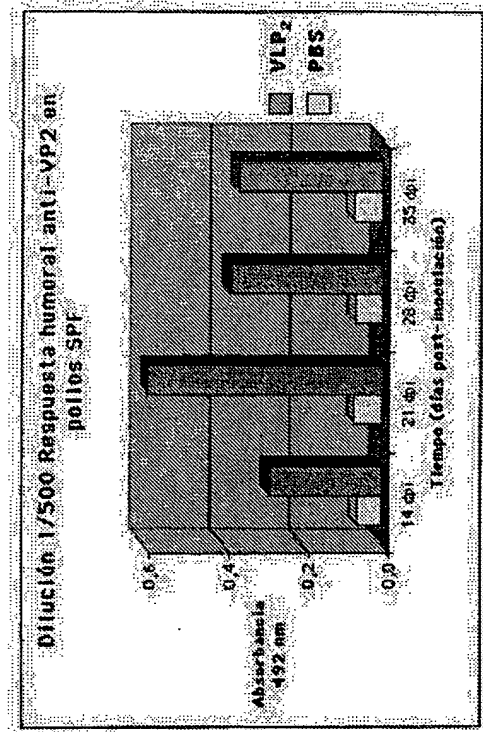
Figura 1

2/4

**Figura 2**

3/4

**Figura 3**

**Figura 4**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K14/08, C12N7/04, A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C07K, C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5614409 A (AZAD, A. A., MACREADIE, I. G., McKERN, N. M. et al.) 25.03.1997. The whole document	1-21
Y	MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J. L., SAUBL, N., PAGÈS-MANTÉ, A., et al. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. Vaccine. July 2003 , Vol 21, N° 23, pages 3342-3350 ISSN 0264-410X	1-21
X	PITCOVSKI, J., GUTTER, B., GALLILI, G., et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. Vaccine. December 2003 , Vol. 21, N° 32, pages 4736-4743 SSN 0264-410X	6-10
A		1-5, 11-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29.07.2005 (29.07.2005)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CASTÓN, J. R., MARTÍNEZ-TORRECÚADRADA, J. L., MARAVER, A., et al. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. Journal of Virology. Noviembre 2001, Vol. 75, N° 22, páges 10815-10828. ISSN 0022-538X	1-21
A	LEJAL, N., DA COSTA, B., HUET, J.-C., DELMAS, B. Role of ser-652 and lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. Journal of General Virology. 2000, Vol. 81, páges 983-992.	1-3, 6, 11-14

Information on patent family members

PCT/ ES 2005/070052

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/070052

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C07K14/08, C12N7/04, A61K39/12

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C07K, C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	US 5614409 A (AZAD, A. A., MACREADIE, I. G., McKERN, N. M. et al.) 25.03.1997. Todo el documento.	1-21
Y	MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J. L., SAUBL, N., PAGÈS-MANTÉ, A., et al. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. Vaccine. Julio 2003, Vol 21, N° 23, páginas 3342-3350. ISSN 0264-410X	1-21
X	PITCOVSKI, J., GUTTER, B., GALLILI, G., et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. Vaccine. Diciembre 2003, Vol. 21, N° 32, páginas 4736-4743. ISSN 0264-410X	6-10
A		1-5, 11-21

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
29.07.2005 (29.07.2005)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 349

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	CASTÓN, J. R., MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J. L., MARAVER, A., et al. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. Journal of Virology. Noviembre 2001, Vol. 75, N° 22, páginas 10815-10828. ISSN 0022-538X	1-21
A	LEJAL, N., DA COSTA, B., HUET, J.-C., DELMAS, B. Role of ser-652 and lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. Journal of General Virology. 2000, Vol. 81, páginas 983-992.	1-3, 6, 11-14

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5614409 A	25.03.1997	CA 2050275 A1	01.12.1990
		WO 9015140 A1	13.12.1990
		AU 5731590 A	07.01.1991
		JP 4505452 T	24.09.1992
		EP 0474676 A4	24.02.1993
		AU 643216 B2	11.11.1993
<hr/>			